

XP-002202046

AN - 1995-251060 [46]  
AP - JP19930305183 19931206  
CPY - CANO  
DC - D15 D16 E16 L03  
DR - 0441-U 0868-U  
FS - CPI  
IC - C02F3/34 ; C12N1/20  
MC - D04-B06E D05-A03 D05-H04 D05-H08 E10-E02E1 E10-H04C E10-H04C3 E11-Q02  
L04-C09  
M3 - [01] H6 H602 H609 H682 H684 H7 H721 M280 M312 M321 M332 M343 M363 M391  
M416 M750 M903 M904 M910 N164 Q231 Q233 Q431 Q437 Q439 Q454; R00441-X;  
0441-U  
- [02] H6 H602 H608 H609 H681 H682 H683 H684 H689 H713 H716 H721 M210  
M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225 M226 M231  
M232 M233 M250 M280 M281 M311 M312 M313 M314 M315 M316 M320 M321 M322  
M323 M331 M332 M333 M340 M342 M363 M391 M392 M393 M416 M620 M750 M903  
M904 N164 Q231 Q233 Q431 Q437 Q439 Q454; 9533-C2401-X  
- [03] G010 G100 H4 H401 H441 H8 M280 M320 M414 M510 M520 M531 M540 M781  
M903 M904 M910 N164 Q231 Q233 Q431 Q437 Q439 Q454; R00868-U; 0868-U  
PA - (CANO ) CANON KK  
PN - JP7155792 A 19950620 DW199533 C02F3/34 006pp  
PR - JP19930305183 19931206  
XA - C1995-114619  
XIC - C02F-003/34 ; C12N-001/20 ; (C12N-001/20 C12R-001/38)  
AB - J07155792 Method for biologically decomposing organochlorine cpds.  
(specifically: trichloroethylene (TCE)) which comprises making the  
chlorine cpds. contact with a microorganism (specifically: *Pseudomonas*  
*cepacia* KKO1, FERM BP-4235) of which the decomposing activity is  
induced by an inducer (specifically; aromatic cpd., e.g. phenol), is  
new.  
- Also claimed is the appts. used for the decomposition of  
organochlorine cpds. using the microorganisms.  
- USE - Method may partic. be applied to decomposition of TCE as  
carcinogen which has been used as detergent in IC industries or in  
cleaning.  
- ADVANTAGE - In the prior art, methane, MeOH or tryptophane has been  
used as inducer in the biological decomposition. IN this invention,  
such dangerous cpds. are not required, there is no environmental  
pollution problems.  
- (Dwg. 1/2)  
C - C12N1/20 C12R1/38  
CN - R00441-X 9533-C2401-X R00868-U  
DRL - 0441-U 0868-U  
IW - DECOMPOSE ORGANO CHLORINE COMPOUND INDUCE MICROORGANISM  
IKW - DECOMPOSE ORGANO CHLORINE COMPOUND INDUCE MICROORGANISM  
NC - 001  
OPD - 1993-12-06  
ORD - 1995-06-20  
PAW - (CANO ) CANON KK  
TI - Decomposition of organo-chlorine cpds. - with induced microorganisms

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-155792

(43)公開日 平成7年(1995)6月20日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 2 F 3/34	ZAB Z			
C 1 2 N 1/00	R 8828-4B			
1/20	F 8828-4B			
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:38)				

審査請求 未請求 請求項の数12 O.L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平5-305183  
(22)出願日 平成5年(1993)12月6日

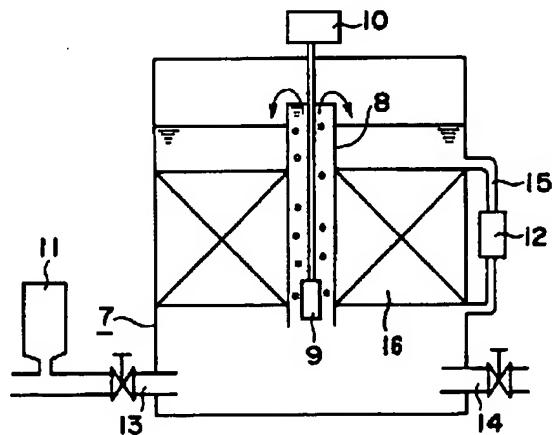
(71)出願人 000001007  
キヤノン株式会社  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号  
(72)発明者 加藤 鈴也  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内  
(72)発明者 今村 剛士  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内  
(74)代理人 弁理士 若林 忠

(54)【発明の名称】 誘導物質を用いた微生物による有機塩素化合物の分解方法、及び係る方法に用いる装置

(57)【要約】

【目的】 誘導物質により汚染物質の分解能が誘導される微生物を用いて汚染物質の分解処理を行う上で、誘導物質が環境中に残存することなく、またそれを確かめる手段を有した微生物分解法及び装置を提供すること。

【構成】 汚染物質の分解能に加えて、誘導物質の分解能を合せ持つ微生物を用いて汚染物質の分解処理を、誘導物質の残存量を測定する手段を用いて行い、かかる分解処理を装置内で行う場合には、誘導物質の残存量を測定する手段を具備した装置を用いる。



### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 有機塩素化合物に、誘導物質により該有機塩素化合物の分解活性が誘導される微生物を接触させて、該有機塩素化合物を分解する生物分解方法において、前記微生物が前記誘導物質を分解する能力を有することを特徴とする生物分解方法。

【請求項2】 前記生物分解を、前記誘導物質の分解量を検出しながら行う請求項1に記載の生物分解方法。

【請求項3】 前記有機塩素化合物が、トリクロロエチレンである請求項1または2に記載の生物分解方法。

【請求項4】 前記誘導物質が、芳香族化合物である請求項1～3のいずれかに記載の生物分解方法。

【請求項5】 前記微生物が、シュードモナス・セパシアである請求項1～4のいずれかに記載の生物分解方法。

【請求項6】 前記微生物が、シュードモナス・セパシア KK01株である請求項1～5のいずれかに記載の生物分解法。

【請求項7】 誘導物質によって有機塩素化合物の分解活性が誘導される微生物を、有機塩素化合物と接触させて、該有機塩素化合物の分解を行う分解処理室と、該分解処理室に前記誘導物質を供給する誘導物質供給手段と、該分解室中の該誘導物質の量を検出する誘導物質検出手段とを有することを特徴とする有機塩素化合物の生物分解装置。

【請求項8】 誘導物質検出手段で検出された誘導物質の量に応じて誘導物質供給手段からの分解処理室への誘導物質の供給量を制御する誘導物質供給量制御手段を更に有する請求項7に記載の生物分解装置。

【請求項9】 前記有機塩素化合物が、トリクロロエチレンである請求項7または8に記載の生物分解装置。

【請求項10】 前記誘導物質が、芳香族化合物である請求項7～9のいずれかに記載の生物分解装置。

【請求項11】 前記微生物が、シュードモナス・セパシアである請求項7～10のいずれかに記載の生物分解装置。

【請求項12】 前記微生物が、シュードモナス・セパシア KK01株である請求項7～11のいずれかに記載の生物分解装置。

### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、有機ハロゲン化合物（有機塩素化合物）の微生物分解法及び装置に関するものである。

#### 【0002】

【従来の技術】 近年、有害で難分解な有機ハロゲン化合物が多種類環境中で検出されるなど、これらによる環境汚染がクローズアップされてきており、生態系に与える影響が懸念されている。したがって、その汚染を防止していくためには、これらの物質を環境に移行させない技

術の開発が急務となっており、廃水中の化学物質を効果的に除去する技術の確立が強く望まれている。

【0003】 特に、トリクロロエチレン（TCE）は、IC産業、ドライクリーニングなどで用いられいている有機塩素化合物であり、発ガン性を有しているといわれ、地下水汚染の問題を含め大きな社会問題となってきている。その除去・分解・浄化は、環境保全の視点から重要な課題となってきており、こうした有機塩素化合物の除去・分解には活性炭による吸着、光・熱による分解等があるが、コスト／操作性の面から微生物分解が注目され始めている。

【0004】 TCE分解能を有する微生物で単離された報告は少なく、TCE分解能を有する微生物としては、*Welchia alkenophila* sero 5 (USP 4877736, ATCC53570)、*Welchia alkenophila* sero 33 (USP 4877736, ATCC53571)、*Methylosinus trichosporium* OB3b (Whitney R, J. Gen. Microbiol. 61: 205-218 (1970)、*Acinetobacter* sp. G4 (Nelson MJK et al, Appl. Environ. Microbiol. Aug.: 383-384 (1986); Folsom BR et al, Appl. Environ. Microbiol. May: 1279-1285 (1990); USP 4925802, ATCC53617、この菌は始め*Pseudomonas cepacia*と分類されていたが、*Acinetobacter* sp.に変更された) *Methylomonas* sp. MM2 (Henry SM et al, Appl. Environ. Microbiol. Jan.: 236-244 (1991))、*Alcaligenes denitrificans* ssp. *xylosoxidsans* JE75 (Ewers J et al, Arch. Microbiol. 154: 410-413 (1990))、*Alcaligenes eutrophus* JMP134 (Harker AR & Kim Y, Appl. Environ. Microbiol. Apr.: 1179-1181 (1990))、*Pseudomonas putida* F1 (Gibson DT et al, Biochem. 7: 2653-2662 (1968); Wackett LP & Gibson DT, Appl. Environ. Microbiol. July: 1703-1708 (1988))、*Mycobacterium* *vaccse* J0B5 (Beam HW & Perry J J, J. Gen. Microbiol. 82: 163-169 (1974); Wackett LP et al, Appl. Environ. Microbiol. Nov.: 2960-2964 (1989), ATCC29678)、*Nitrosomonas europaea* (Arciero D et al, Biochem. Biophys. Res. Comm. 159: 640-643 (1989))、*Pseudomonas fluorescens* PFL12 (Vandenbergh PA & Kunka BS, Appl. Environ. Microbiol. Oct.: 2578-2579 (1988))、*Lactobacillus* *fumtorans* RE (Kunkee, Int. J. Syst. Bact. 30: 313-314 (1980); J. Appl. Bact. 34: 541-545 (1971))、*Lactobacillus vaginalis* sp. nov. (Embley TM et al, Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 368-370 (1989), ATCC49540)、*Methylosinus trichosporium* (特開平2-92274号公報、特開平3-292970号公報)などがある。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、これらの菌の多くはメタン資化性菌であり、分解にはメタン、メタノール等の誘導物質を要求し、それ以外の菌でもトリプトファン、フェノール等を誘導物質として必要とし、実用

上十分な条件を満たしているとはいがたい。特に、メタンは可燃性であること、またフェノールは毒性、環境への影響が懸念されており、これらを誘導物質として加えて放置させておくことは問題である。一方、微生物自体を遺伝子的に改変して誘導物質を必要としないようする試みもなされているが、まだ基礎的な研究段階に留まっている。

【0006】従って、本発明の目的は、誘導物質が環境中に残存することなく、またそれを確かめる手段を有した微生物分解法及び装置を提供するものである。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の生物分解方法は、有機塩素化合物に、誘導物質により該有機塩素化合物の分解活性が誘導される微生物を接触させて、該有機塩素化合物を分解する生物分解法において、前記微生物が前記誘導物質を分解する能力を有することを特徴とする。

【0008】また、本発明の生物分解装置は、誘導物質によって有機塩素化合物の分解活性が誘導される微生物を、有機塩素化合物と接触させて、該有機塩素化合物の分解を行う分解処理室と、該分解処理室に前記誘導物質を供給する誘導物質供給手段と、該分解室中の該誘導物質の量を検出する誘導物質検出手段とを有することを特徴とする。

【0009】本発明に用いる微生物は、有機ハロゲン化合物（有機塩素化合物）の分解能を持つと同時に誘導物質を分解する能力をもつ微生物ならびにかかる微生物でもよく、未同定の菌、単離がなされていない菌、共生系でもまったく問題はない。例えば、メタン共存下でTCEを分解するOB3b、フェノールを誘導物質とするシードモナス・セパシアKK01株（FERM BP-4235）などを本発明に用いることができる。これらの微生物は、有機ハロゲン化合物の分解能を有すると同時に誘導物質をも分解するため、誘導物質が環境中に残ることなく分解され、誘導物質の環境への影響を抑えることができる。本発明が実施される環境汚染の場は、例えば水系、土系、開放系、閉鎖系があり、また微生物をそのまま用いても担体などに付着させて用いるなどなんら制限はない。

【0010】また、係る分解反応処理を、誘導物質が分解されたかを測定する手段を用いて行うことが安全性の面からも特に好ましい。この測定手段は、所望の精度を満たすものならいかなる形態でも良いが、例えば吸光スペクトルの測定、ガスクロマトグラフィー、呈色反応などを用いるものが挙げられる。

【0011】係る分解処理は、例えば図1、2に示す装置によって行うことができる。図1に示した装置は、有機塩素化合物を含む廃水のバッチ式での浄化装置として利用できるものであり、分解処理槽1、栄養物補給槽2、誘導物質供給槽3、誘導物質の濃度測定ユニット4

を有する。

【0012】この装置では、廃水は導入口5から導入され、排出口6から排出される。廃水中の有機塩素化合物濃度は、必要に応じて希釈などの方法で調節してもよい。分解処理槽1内に導入された廃水に、有機塩素化合物分解菌を接種して、必要に応じて攪拌、通気及び温度制御を行う。また、必要であれば、栄養物補給槽2から分解菌の増殖、維持のための栄養物を補給する。分解活性の誘導は、誘導物質供給槽3から誘導物質を分解処理槽1内に供給することにより行う。誘導物質の量は、分解処理開始時の初期濃度として設定しても良いし、分解処理過程を通して所望の濃度に維持しても良い。分解処理槽1内の誘導物質の濃度は、濃度測定ユニットで測定することでモニターできる。分解処理槽1内に充填した廃水中の有機塩素化合物の濃度も、不図示のサンプリングロから廃水の一部を取って、モニターし、その分解が完了したところで、排出口6から浄化された廃水を排出させる。誘導物質も分解される条件を設定すれば、誘導物質を含まない浄化廃水が得られる。また、誘導物質の分解が有機塩素化合物の分解よりも遅れて起る微生物を用いれば、誘導物質の量のみをモニターすることで、有機塩素化合物の分解状況を把握できる。

【0013】図2に示す装置は、閉鎖系で、連続分解処理を行う場合に利用できる廃水処理装置であり、分解処理槽7内の中心にドラフトチューブ8を設け、その周囲に濾過材16を配置した構造を有する。ドラフトチューブ8には、散気管9が挿入されており、エアーポンプ10での通気による気泡の上昇に伴って、処理水がドラフトチューブ8内を上昇する流れが生じ、上方に到達した流れは、濾過材16を通過して循環する。濾過材16には分解菌を固定し、誘導物質を廃水に供給して有機塩素化合物の分解処理を行う。誘導物質は、廃水を処理層内に供給する前に誘導物質供給装置11から廃水中に導入する。誘導物質の量は、単位菌体あたりの分解活性が所望の高さとなるように設定される。

【0014】処理中は、必要に応じて、廃水に栄養物を補給したり、適当な手段による通気、攪拌、温度調節を行っても良い。誘導物質の分解状況は、バイパスに設けた濃度測定装置12でモニターできる。排出口14から流出した廃水中の有機塩素化合物濃度をモニターすることで、分解処理の状況を把握する。

【0015】この装置での分解処理は、まず、廃水に誘導物質を所定量で添加し、これを導入口13から分解処理槽7内に導入する。流出口14を閉じた状態で分解処理槽7内に廃水を充填し、エアーポンプ10での通気により、廃水を循環させる。この状態で、濾過材16の上部に不図示の接種口から分解菌を接種し、濾過材16中に定着させて、分解処理を開始する。

【0016】分解処理槽7内の誘導物質の濃度は、細管15により設けたバイパス中に組み込んだ測定ユニット

によりモニターする。排出口14から廃水をサンプリングして有機塩素化合物濃度を測定し、所望の分解率が得られたところで、排出口を開け、廃水の流量を調節して、連続処理を行う。処理された廃水中の有機塩素化合物濃度および分解処理槽中の誘導物質濃度をモニターし、その結果から単位菌体あたりの最適分解活性がられるように誘導物質供給装置11からの誘導物質の添加量を制御してもよい。

#### 【0017】

【実施例】以下実施例により本発明を更に詳細に説明する。なお、各実施例で用いたM9培地は下記の組成を有するものである。

M9培地組成(1リットル中)；

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6. 2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3. 0 g
NaCl	0. 5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1. 0 g
水	残部

(pH 7. 0)

#### 実施例1

タカサゴシロアリのハタラキシロアリを10匹シャーレにとり、エチルアルコール(95%)をこれに注ぎシロアリ表面を殺菌した。次に、0.05%のフェノールを含有するM9培地でシロアリを2回洗い、その表面からエチルアルコールを除去した。洗浄後、シロアリの腸を

ピンセットで摘み出し、それを0.05%のフェノールを含有するM9培地中でり潰し、腸破碎物を含む液状混合物を得た。この混合物の一部を、0.05%フェノール及び0.05%酵母エキストラクトを含有するM9培地に接種し、30℃で好気条件下で培養した。その結果、この混合物内にフェノール資化性の微生物が存在することがわかった。

#### 【0018】実施例2

実施例1のM9培地(0.05%フェノール及び0.05%酵母エキストラクトを更に含有する)での培養により得られた培養液(増殖菌体を含む)を、フェノール含有M9寒天培地(0.05%フェノール及び1.2%寒天を含む)の表面に塗布し、30℃で2日間培養した。寒天培地上に良好に生育してきたコロニーを単離株として得た。単離株の1つについてその菌学的性質を調べたところ下記の結果が得られ、この単離株はショードモナス・セパシアに属するものであるとの結論に至った。

#### A. 形態的性状

- (1) グラム染色：陰性
- (2) 菌の大きさ及び形：長さ1.0~2.0 μm、幅0.5 μm前後の桿菌
- (3) 運動性：あり

#### B. 各種培地における生育状況

#### 【0019】

#### 【表1】

培地	培養温度(℃)	生育状態
血液寒天培地	37	+
乳糖寒天培地	37	+
チョコレート寒天培地	37	++
GMA	37	-
スキロー	37	-
普通寒天培地	4	-
普通寒天培地	25	±
普通寒天培地	37	+
普通寒天培地	41	±

#### C. 生理的性質

- (1) 好気性、嫌気性の区別：偏性好気性
- (2) 糖の分解様式：酸化型
- (3) オキシダーゼの生成：+
- (4) 硝酸銀の還元：+
- (5) 硫化水素の生成：-
- (6) インドールの生成：-
- (7) ウレアーゼの生成：-
- (8) ゼラチンの液化：-
- (9) アルギニンの加水分解：-
- (10) リジンの脱炭酸：+
- (11) オルニチンの脱炭酸：-

- (12) クエン酸の利用：+
- (13) メチルカルビノールアセチル反応(VP反応)：-
- (14) トリプトファンデアミナーゼの検出：-
- (15) ONPG：-
- (16) 炭水化物類の利用性：
- ブドウ糖：+
- 果糖：+
- 麦芽糖：+
- ガラクトース：+
- キシロース：+
- マンニット：±

白糖： —  
乳糖： +  
エスクリン： —  
イノシット： —  
ソルビット： —  
ラムノース： —  
メリビオース： —  
アミグダリン： —  
L- (+) -アラビノース： +

この単離株を、0.05%フェノール及び0.05%酵母エキストラクトを含むM9培地(5ml)中で30℃で培養し、培養液から濾過により上清をサンプリングし、そのフェノール濃度を分光光度計を用いて270nm近傍の光吸収を測定することで定量した。その結果、培養4日目に約60%のフェノールの分解が行われ、この単離株が卓越したフェノール分解活性をもあわせ持っていることが確認された。従来既知のシュードモナス・セパシアでは、フェノール分解活性を有するものは存在しないことから、この菌株は新菌株であると認定し、KK01株と命名して、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した(寄託日：平成4年3月11日、寄託番号FERM P-12869)。なお、この寄託は、平成5年3月9日付でブタペスト条約に基づく国際寄託(FERM BP-4235)に変更された。

#### 【0020】実施例3

実施例2で単離したKK01株(FERM BP-4235)を、5mlの培地(M9培地に、5ppmTCE、0.05%酵母エキス及び100ppmフェノールを添加)に接種し、30℃で種培養を2日間行った。

【0021】バイアル瓶に15mlの培地(M9培地に、5ppmTCE、0.05%酵母エキス及び100ppmフェノールを添加)を入れ、これに先の種培養の培養液から0.1ml(菌体を含む)を接種した後、ブチルゴム栓及びアルミシールで完全密封し、30℃で培養した。TCE量は、ヘッドスペース法によりガスクロマトグラフィー(島津ガスクロマトグラムGC-9AM)で定量し、TCEの除去率を求めた。また、同時にフェノールの残存量も分光光度計を用いて吸光度(270nm)を測定することで求めた。TCE分解については、わずか一日でFID検出器(水素炎イオン化検出器)の検出限界以下まで分解が進み、フェノール濃度もわずか3日で測定限界以下となり溶液は完全に浄化された。

#### 【0022】実施例4

TCEの濃度を15ppmとした以外は実施例3と同様にして培養を行った。実施例3と同様に、TCE量は、ヘッドスペース法によりガスクロマトグラフィーで定量し、TCEの除去率を求め、同時にフェノールの残存量も分光光度計を用いて吸光度(270nm)を測定することで求めた。TCE分解については、わずか一日で9

5%まで分解が進み、フェノール濃度もわずか3日で測定限界以下となり溶液は完全に浄化された。

#### 【0023】実施例5

神奈川県厚木市森の里より採取した褐色森林土1gを、フェノール濃度100ppmに調整したM9培地15mlに加え30℃で培養を3日間行った。その0.1mlを同様の組成の寒天平板培地上で培養してプレートカウントしたところ、土壌1gあたり $10^6\sim 10^7$ 個の、数種類の菌がカウントされた。

【0024】バイアル瓶に15mlの培地(M9培地に、0.5ppmTCE、0.05%酵母エキス及び100ppmフェノールを添加)を入れ、これに上記のように芳香族化性菌の存在が確認された土壌1gを加え、ブチルゴム栓及びアルミシールで完全密封し30℃で7日間培養した。実施例3と同様の方法で、TCE量を測定したところ、測定限界以下であった。また、同時にフェノールの残存量も求めたところ測定限界以下であり、完全に浄化された。

#### 【0025】実施例6

濾過材として、ポリスチレン製濾過材を用い、誘導物質濃度の測定ユニットとして、270nm付近の吸光度を検出する装置を組み込んだ図2に示す装置によるモデル汚染地下水の浄化処理を行った。

【0026】まず、モデル汚染地下水として、M9培地に0.5ppmのTCEを添加したものを用意した。このモデル汚染培地に誘導物質供給装置からフェノールを、その添加量が100ppmとなるように添加し、排出口を閉じた状態で導入口から分解処理槽内に充填した。分解処理槽内の温度を22℃として、エアーポンプでの通気を行い、モデル汚染地下水を循環させるとともに、KK01株を濾過材上部に接種した。この状態で、しばらく循環を続け後、排出口を開けて、モデル地下水の導入および排出の流速を5.0ml/minに維持し、更に処理を続けたところ、排出口から排出された水中的のフェノール及びTCEの量が検出限界以下となり、その状態で連続的に浄化処理を続けることができた。

#### 【0027】

【発明の効果】本発明によって、環境に負担をかけない有機塩素化合物の生物処理が可能になった。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法に用い得る装置の一例を示す断面図である。

【図2】本発明の方法に用い得る装置の他の一例を示す断面図である。

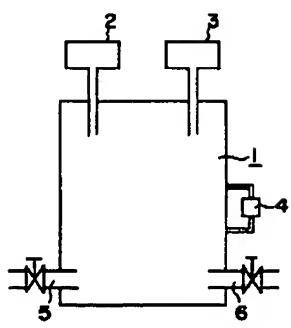
#### 【符号の説明】

- 1 分解処理槽
- 2 栄養物補給槽
- 3 誘導物質供給槽
- 4 誘導物質の濃度測定ユニット
- 5 導入口

6 排出口  
7 分解処理槽  
8 ドラフトチューブ  
9 散気管  
10 エアーポンプ  
11 誘導物質供給装置

12 濃度測定装置  
13 導入口  
14 流出口  
15 細管  
16 濾過材

【図1】



【図2】

